us der Universitäts-Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke Würzburg
Direktor: Professor Dr. W. KLEY

ZUR PATHOPHYSIOLOGIE DER MÉNIÈRESCHEN KRANKHEIT

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Birgit Zenner, geb. Klehn

aus Göttingen

Würzburg, den 1. Oktober 1982

s der Universitäts-Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke Würzburg
Direktor: Professor Dr. W. KLEY

ZUR PATHOPHYSIOLOGIE DER MÉNIÈRESCHEN KRANKHEIT

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Birgit Zenner, geb. Klehn

aus Göttingen

Würzburg, den 1. Oktober 1982

Referent	:	Professor Dr. W. KLEY
Korreferent	:	Professor Dr. K. FOET
Dekan	:	Professor Dr. K.-A. BUSHE

Tag der mündlichen Prüfung: 8.12.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

MEINEN ELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543522_0103

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	3
2.	GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK	6
3.	MATERIAL UND METHODEN	7
3.1	Material	7
3.2	Methoden	8
3.2.1	Präparation der Cochlea	8
3.2.2	Präparation der Zellmembran	8
3.2.3	Enzym-Test	9
4.	ERGEBNISSE	12
4.1	Präparation der häutigen Cochlea	12
4.2	Wirkung von Choleratoxin	15
4.3	Wirkung von physiologischen Aktivatoren	17
5.	DISKUSSION	24
6.	ZUSAMMENFASSUNG	31
7.	LITERATURVERZEICHNIS	34
8.	LEBENSLAUF	40

ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DTE	Dithioerythrol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GABA	Gammaaminobuttersäure
Gpp (NH)p	Guanylylimidodiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NAD^+	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
PGE_1	Prostaglandin E_1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

1. EINLEITUNG

Beim Morbus Ménière handelt es sich um eine Erkrankung des Innenohrs, die anfallsweise mit Schwerhörigkeit, Ohrgeräuschen und Schwindel, häufig von Übelkeit und Erbrechen gefolgt, auftritt. Diese Anfälle dauern Minuten bis Stunden und wiederholen sich in Tagen oder Wochen. Im Intervall sind die Ohrgeräusche abgeschwächt, die Schwerhörigkeit bessert sich nur anfangs, sie nimmt von Anfall zu Anfall zu, gelegentlich bis hin zur völligen Ertaubung des betroffenen Ohres.

Ähnlich zeigt das Vestibularorgan im Intervall zunächst normale Funktion, nach mehreren Anfällen entwickelt sich eine Untererregbarkeit (5).

Als ein morphologisches Substrat dieser Erkrankung wird ein Endolymphhydrops angesehen (15), (Abb.1). Der molekulare Mechanismus des Flüssigkeitstransports in oder aus dem Endolymphraum der Cochlea muß dabei eine wesentliche Rolle spielen. Dabei ist unklar, ob es sich um eine Produktions- oder Resorptionsstörung handelt (40).

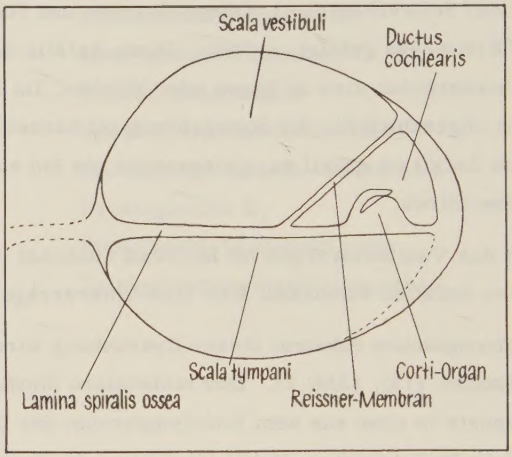
Nach VOSTEEN kann die Endolymphe als Perilymphfiltrat aufgefaßt werden (48), welches in der Stria vascularis aktiv unter Energieverbrauch produziert wird. Als molekularer Mechanismus muß dabei wesenlich die Na/K-abhängige ATPase beteiligt sein, welche Natrium aktiv zu pumpen in der Lage ist.

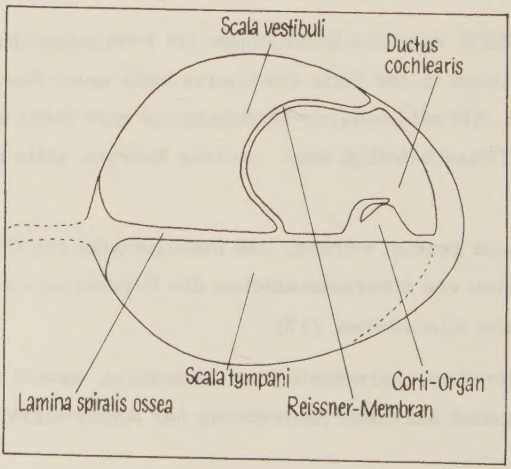
Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Instillationen von Choleratoxin in den Endolymphraum von Meerschweinchen die Produktion von Endolymphe auf das 2 1/2 fache stimulieren (13).

In anderen Geweben, vornehmlich im Dünndarm, beruht der Mechanismus des Choleratoxins auf einer Aktivierung der Adenylatzyklase (52). Es ist

Abb. 1: Der Endolymphhydrops als morphologisches Substrat des M. Ménière

(a) zeigt den Endolymphraum (Ductus cochlearis) als Schema im Querschnitt beim Gesunden, während (b) die verlagerte Reissner' sche Membran als Ausdruck des Endolymphhydrops darstellt.





daher anzunehmen, daß beim choleratoxin-induzierten Endolymphhydrops die Adenylatzyklase eine wesentliche Rolle spielt. Die Existenz von Adenylatzyklase im Innenohr wurde erstmals von THALMANN und Mitarbeitern nachgewiesen, ohne daß Einzelheiten über die physiologische Steuerung bekannt wurden (1). Das Enzym spielt nämlich in anderen Geweben eine Schlüsselrolle innerhalb des Stoffwechselgeschehens, weil es am Signaltransport vom Extrazellulärraum nach intrazellulär wesentlich beteiligt ist (44). Die Adenylatzyklase ist ein zellmembrangebundenes Enzym, das in allen bisher untersuchten Geweben zu finden ist. Nach Besetzung eines Rezeptormoleküls an der Außenseite der Zelle durch einen Transmitter wird das Enzym aktiviert und aus ATP der chemische Bote cAMP produziert, welcher dann intrazellulärer Informationsträger ist (44).

Ziel dieser Arbeit ist es daher, zu untersuchen, ob bei dem durch choleratoxin-induzierten Labyrinthhydrops die Aktivierung der Adenylatzyklase beteiligt ist. Zum anderen sollen durch systematische Suche physiologische Aktivatoren dieses Schlüsselenzyms gefunden werden, welche möglicherweise an der Entstehung des Labyrinthhydrops beteiligt sein könnten.

2. GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK

Die Ménièresche Krankheit[+] wurde nach dem französischen Arzt Prosper Ménière benannt, der zu den angesehensten Otologen seiner Generation zählte.

Er lebte von 1799 bis 1862. 1828 erhielt Ménière den Doktorgrad an der Universität Paris. Seine praktische Ausbildung erwarb er an den Kliniken CHOMEL und DUPUYTREN. Nach dem Tode ITARDS wurde er Leiter des Taubstummeninstituts in Paris. Gleichzeitig wurde ihm der Titel "Agrégé de la Faculté" verliehen (36).

Seine wohl bedeutendste Arbeit ist die Mitteilung 1861 "Sur les lésions de l'oreille interne donnant lieu à des symptômes de congestions apoplectiformes" in der Académie de Médicine (31). Hierin wurde erstmals eine mit Schwindel, Ohrensausen und apoplektiformen Symptomen verbundene Höraffektion beschrieben, die seither als Morbus Ménière oder Ménièrescher Symptomenkomplex bekannt ist.

+ Zur korrekten Schreibweise vergleiche die von WATANABE vorgelegte Dokumentation (49).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP), Guanosintriphosphat (GTP), Guanylimidodiphosphat (Gpp(NH)p), Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase wurden bei Boehringer Mannheim hergestellt.

Lysin-Vasopressin, DL-Isoproterenol, Glucagon, Gammaaminobuttersäure (GABA), PGE_1 und Oxytocin wurden bei Sigma München erworben.

^3H cAMP (25 Ci/nmol) wurde im Radiochemischen Center Amersham, England, erzeugt.

Alle weiteren Reagenzien wurden im Handel mit bestmöglichem Reinheitsgrad bezogen. Es wurde nur Aqua bidestillata benutzt. cAMP-bindendes Protein wurde aus Zwerchfellmuskel des Rinds präpariert und freundlicherweise von Professor Dr. Th. Pfeuffer, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, zur Verfügung gestellt.

3.2 METHODEN

3.2.1 Präparation der Cochlea

300 junge Meerschweinchen beiderlei Geschlechts mit positivem Preyer-reflex und einem Gewicht zwischen 200 und 300 Gramm wurden anfangs mit Aether anaesthesiert. Nach Punktion der A. carotis erfolgte eine Perfusion der Köpfe mit 20 mOsm Phosphat, 0,15 M NaCl, 1mM EDTA, 1mM Dithioerythrol, 10^{-5} M Phenylmethylsulfonylfluorid und 3mM $MgSO_4$-Puffer, pH = 7,4, (Puffer Nr. 1), um Blut und Plasma zu entfernen. In späteren Versuchen wurde auf Perfusion und Narkose verzichtet.

Alle folgenden Teilschritte wurden zwischen $0^{\circ}C$ und $4^{\circ}C$ durchgeführt: Nach Dekapitation der Tiere wurde der temporale Knochenanteil des Schädels abgetrennt und die Bulla eröffnet.

Die anschließende Feinpräparation wurde unter dem Mikroskop durchgeführt. Mit Hilfe einer Uhrmacherpinzette wurde von der Spitze der knöchernen Cochlea senkrecht zur Basalwindung hin ein Spalt gebrochen. Von den Bruchkanten ausgehend wurde vorsichtig die knöcherne Schale abgetragen. Bei freiliegendem Modiolus wurde von der Spitze ausgehend entlang der Windungen bis hin zur Basis das Gewebe der häutigen Cochlea extrahiert.

3.2.2 Präparation der Zellmembran

Um die bestmögliche Ausbeute an Zellmembranen zu erzielen, wurden verschiedene Präparationsverfahren eingesetzt und verglichen:

a) Pottern: Das Gewebe wurde im Potter-Homogenisator durch zehn bis zwanzig Hübe homogenisiert. Um mögliche Knochenreste zu eliminieren, wurde der Überstand dekantiert und 10 min. bei $0^{\circ}C$ und 5000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag in dem jeweils zu den einzelnen Versuchen eingesetzten Puffer aufgenommen.

b) Gefrier-Tauen: Das Gewebe wurde in Puffer gewaschen, danach in flüssigen Stickstoff getaucht und gleich darauf in etwa 30°C warmem Wasser getaut. Dieser Gefrier-Tau-Vorgang wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. Schließlich wurde das Gewebe 10 min. bei 0°C und 3000 g zentrifugiert. Der gewonnene Überstand enthielt das Cytoplasma, das Pellet die Zellmembranfraktion.

c) Rotierende Messer: Das Gewebe wurde in Puffer Nr. 1 im Verhältnis 1:10 aufgenommen und 30 sec. bei 0°C mittels rotierenden Messern (Bühler, Stufe 5) homogenisiert. Der Überstand wurde dekantiert, um Knochenreste zu beseitigen und bei 5000 g und 0° C für 15 min. zentrifugiert. Es entstanden mehrere Schichten im Niederschlag, deren obere verwandt wurde. Die Prozedur wurde einmal wiederholt.

d) Sonstige Puffer: Anfänglich wurden zur Ermittlung des besten Puffergemischs auch folgende Zusammensetzungen verwandt: Puffer Nr. 2: 50mmol Tris, 1mmol EDTA, 3mmol NaN_3 und 0,2mol NaCl, pH = 7,5 ("Choleratoxin-Puffer"). Puffer Nr. 3: 0,25mol Glucose, 2mmol $MgCl_2$, 1mmol EDTA, 3mmol DTE und 0,1mol Tris, pH = 7,5 ("Hirnzyklase-Puffer").

3.2.3 Enzym Test

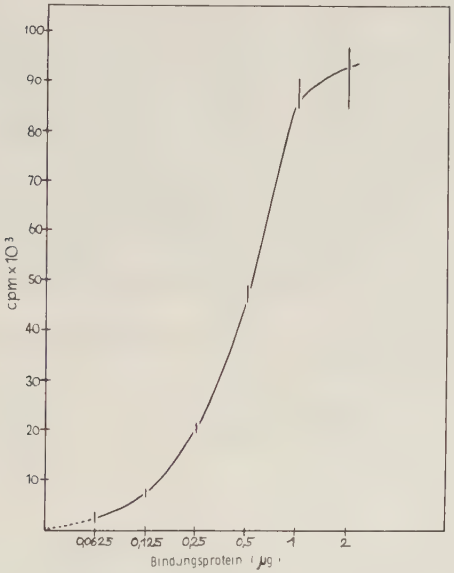
Die aufbereiteten Zellmembranen (200 - 300 ug) wurden in einem Endvolumen von 160 - 200 ul für die Bestimmung der Adenylzyklase eingesetzt. Der Bestimmungsansatz enthielt: 1mM ATP, 6mM Theophyllin, 5mM $MgCl_2$ und $5x10^{-5}$M Isoproterenol im Falle der Katecholaminaktivierung oder 10mM $MgCl_2$ und 10mM NaF für die Fluoridstimulierung, gelöst in 40mM MOPS-Puffer pH = 7,4. Als ATP-regenerierendes System wurde dieser Mischung 10mM Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase zugesetzt. Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert und anschließend 4 min. in ein kochen-

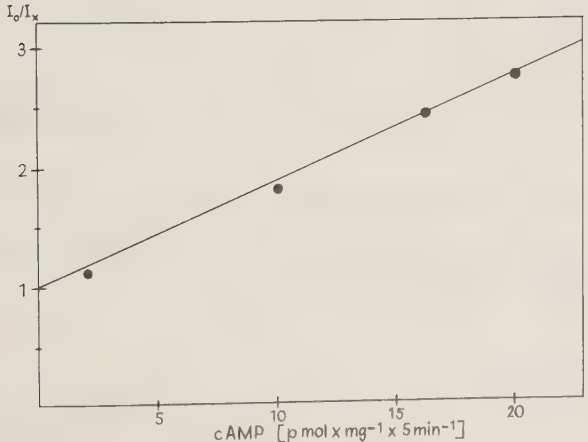
des Wasserbad getaucht, um die Reaktion zu beenden. Das gebildete cAMP wurde mit der Methode nach GILMAN (14) nach Erstellen einer Eichkurve (Abb. 2, a+b) bestimmt:

Nachdem allen Proben 50 ul 0,2M Acetat-Puffer pH = 4,0 (Puffer Nr. 4) zugesetzt wurden, wurden sie 10 min. bei 5000 g und 0-4^{o}C zentrifugiert. 100 ul des gewonnenen Überstands wurden den einzelnen Proben entnommen und bei 0^{o}C weiter verarbeitet. Mit einer Hamilton-Spritze wurden 20 ul ^{3}H -cAMP (0,5Ci/nmol) zugesetzt und nach sorgfältigem Mischen jedes Ansatzes 2 ug cAMP-bindendes Protein hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 100 min. bei 0^{o}C wurden die Proben jeweils mit 1ml eines 20mM K-Phosphat-Puffers, pH = 6,0 (Puffer Nr. 5), versetzt. Auf einem mit demselben Puffer angefeuchteten Acetat-Filter (Millipore 113) mit einer Porengröße von 0,45 u wurde die Lösung filtriert und mit 10ml des K-Phosphatpuffers nachgespült. Die Filter wurden 5 min. bei 80^{o}C getrocknet, in 20ml Scintillationsgefäßen mit 2ml Äthylenmonoglycoläther aufgelöst, indem sie ca. 1min. kräftig geschüttelt wurden. 8ml einer 0,8 % Scintimix-Toluol-Lösung wurden dazugegeben, und nach erneutem kräftigem Durchmischen wurden die Proben im Scintillationszähler (Packard) gemessen.

Abb. 2: Eichen der cAMP-Bestimmung nach GILMAN (14)

(a) Durch Bestimmung der Bindungskurve des präparierten Proteins aus Rinderzwerchfellmuskulatur wurde eine geeignete Konzentration des Bindungsproteins ermittelt. (b) In der Eichkurve wurden bekannte cAMP-Konzentrationen wie angegeben zum Bindungsprotein addiert und dem Quotienten aus Blindwert (Io) und Meßwert (Ix) gegenübergestellt. Bei der Messung des cAMP im Innenohr wurde Io/Ix ermittelt und die korrespondierende cAMP-Konzentration in der Eichkurve abgelesen.





4. ERGEBNISSE

4.1 PRÄPARATION DER HÄUTIGEN COCHLEA

Ursprüngliches Ziel dieser Arbeit war es, die einzelnen Strukturen der Meerschweinchencochlea getrennt zu untersuchen. Hierzu diente die Gefriertrocknungsmethode nach MATSCHINSKY und THALMANN (29). Als Indikator für die Anwesenheit von Adenylatzyklase wurde die Aktivität mit oder ohne Natriumfluorid gemessen. Die Fähigkeit des Fluorid-Ions, einem unphysiologischen Aktivator, Adenylatzyklase zu stimulieren, kann in den meisten Geweben mehrzelliger Organismen beobachtet und als Nachweis für die Anwesenheit von Adenylatzyklase eingesetzt werden (38).

Abgesehen von einer Basal- und Natriumfluoridaktivität konnten bei der Untersuchung einzelner Cochleakompartimente (Corti-Organ, Stria vascularis) keine Stimulationen durch andere Aktivatoren ermittelt werden. Eine mögliche Ursache ist die durch die Präparation bedingte Schädigung der Zellmembranen.

Aus den Untersuchungen von THALMANN und Mitarbeitern (1) war bekannt, daß von einer im Vergleich zu anderen Geweben niedrigen Gesamtaktivität der membrangebundenen Adenylatzyklase auszugehen war. Gleichzeitig stellt das Innenohr ein derart winziges Organ dar, daß bei seiner Aufbereitung eine maximale Ausbeute von Enzymaktivität zu erzielen erforderlich war, um eine Meßbarkeit der Aktivität zu gewährleisten. So ergab beispielhaft die Präparation von zwanzig Meerschweinchencochleae typischerweise nur 10 mg Protein in der rohen Membranfraktion.

In den folgenden Versuchen wurde daher die vom Knochen befreite häutige Cochlea als ganzes, ohne die Unterteilung in einzelne Kompartimente und ohne Gefriertrocknung gebraucht.

Da von einer Lokalisation des Enzyms in der äußeren Zellmembran auszugehen war, war darüberhinaus ein geeignetes Verfahren notwendig, aus dem Rohgewebe die Zellmembranfraktion zu präparieren.

Als erstes wurden hierbei die Bedingungen der Membranpräparation der Cochlea verglichen, unter denen Adenylatzyklase gemessen werden konnte.

Daneben wurde der Einfluß verschiedener Puffersysteme verglichen. So war in der nach Homogenisation des perfundierten Cochleagewebes mittels Potter-Homogenisator oder Kälteschock bis -195°C (Gefrier-Tauen) durch Zentrifugation (500 g, 4°C) gesammelten Rohmembran Adenylatzyklase nicht reproduzierbar nachzuweisen. Ein Verfahren der Membranpräparation, bei welchem die höchste Enzymaktivität gemessen wurde, konnte herausgestellt werden: Nach Homogenisierung des Gewebes durch rotierende Messer und Zentrifugation wurde der größte Anteil an Adenylatzyklaseaktivität reproduzierbar in der Membranfraktion gefunden (Tab. 1, Abb. 3). Analog zu anderen Zellsystemen konnte daher gezeigt werden, daß dieses Enzym in der Cochlea des Meerschweinchens zum überwiegenden Teil in der Zellmembran lokalisiert ist.

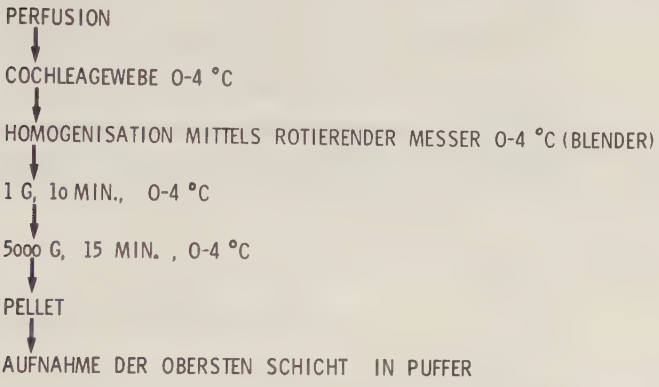
Tab. 1: Erhaltung der cAMP-Produktion des Innenohrs bei verschiedenen Präparationsverfahren und Puffern:

Die Numerierung der Puffer bezieht sich auf den Abschnitt Material und Methoden. Als schonenstes Präparationsverfahren kann die Membranpräparation mittels rotierender Messer bei Inkubation in Puffer 1 herausgestellt werden.
(a) Aktivierung der Adenylatzyklase durch Gpp(NH)p.
(b) Aktivierung durch Isoproterenol.
(+: Aktivierung reproduzierbar, (+): nicht reproduzierbar, ∅ : keine Aktivierung).

		Präparationsverfahren		
	Puffer	Potter	rotierende Messer	Gefrieren + Tauen
a)	Puffer 1	(+)	+	+
	Puffer 2		∅	∅
	Puffer 3		+	
b)	Puffer 1	∅	+	+
	Puffer 2		∅	∅
	Puffer 3		(+)	

Abb. 3: Schema der Präparation der Membranfraktion aus Cochleagewebe des Meerschweinchens

Dieses Verfahren ließ die beste Konservierung des Enzyms Adenylatzyklase zu. (Einzelheiten siehe Material und Methoden.).



4.2 WIRKUNG VON CHOLERATOXIN

Choleratoxin wirkt im Dünndarm in-vivo und in zahlreichen anderen Geweben in-vitro durch Aktivierung der Adenylatzyklase (52). Beobachtungen, daß Choleratoxin experimentell einen Endolymphhydrops beim Meerschweinchen induziert (13), ließen es daher notwendig erscheinen, den Wirkungsmechanismus dieses Giftes auch im Innenohr zu untersuchen. An partikulärer Zellpräparation (also Zellfragmenten, welche nach Zentrifugation den Niederschlag bilden) konnte gezeigt werden, daß die Wirkung des Choleratoxin in Analogie zu anderen Geweben (52) die Anwesenheit der aktiven Unterein-

heit A, von NAD^+, von ATP sowie von Zytoplasma im Innenohr benötigt (Tab. 2).

Tab. 2: Aktivierung der Innenohrzyklase durch Choleratoxin

aus getrennten Versuchen von sechs verschiedenen Innenohrpräparationen. Die Membranfraktion wurde in Anwesenheit des autologen Zytoplasmas für 45 min. vorinkubiert (b). Das autologe Zytoplasma konnte durch xenogenes Zytoplasma von Taubenerythrozyten oder Rinderhirn ersetzt werden. Die Versuche wurden in Gegenwart von NAD^+ (1mM) durchgeführt, dessen Entfernung jedoch keine signifikante Aktivitätsminderung erbrachte, offenbar weil sich endogenes NAD^+ in der Zytoplasmafraktion befand. Dagegen hatte das Fehlen von NAD^+ bei Versuchen o h n e Vorinkubation eine Aktivitätsverringerung zur Folge (a).

	Aktivator	cAMP (pmol x mg^{-1} x 5 min^{-1})
a)	ohne Zusatz	∅
	Choleratoxin + Zytoplasma (5 µg/ml)	1,0
	Choleratoxin + NAD^+ (5o µmol) + Zytoplasma	2,0 - 7,5
b)	ohne Zusatz	2,5
	Gpp (NH) p (1 x $1o^{-5}$ mol)	4,2 - 2o,6
	Choleratoxin + Zytoplasma	4,3 - 16,3
	Choleratoxin + NAD^+ + Zytoplasma	4,5 - 5,0

4.3 WIRKUNG VON PHYSIOLOGISCHEN AKTIVATOREN

Die Aktivierung des Enzyms Adenylatzyklase durch Fluorid und Choleratoxin macht keine Aussagen über die physiologische Steuerung dieses Enzyms im Hörorgan. Aus Versuchen mit anderen Geweben ist bekannt, daß als physiologische Aktivatoren Hormone und Neurotransmitter in Betracht zu ziehen sind (38), welche an Rezeptoren der äußeren Zellmembran binden.

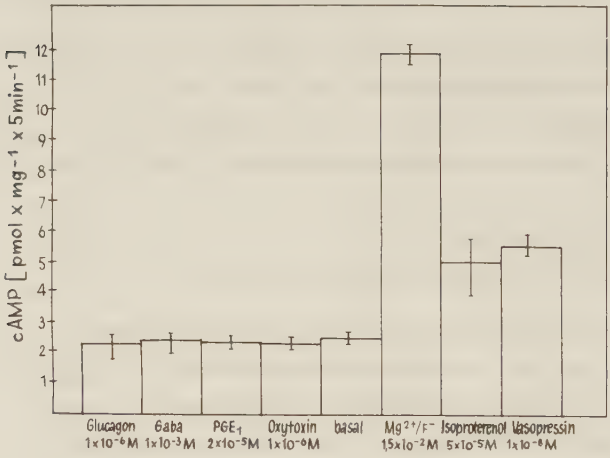
Die Membranpräparationen der häutigen Cochlea wurden bei 37°C mit verschiedenen Neurotransmittern und Hormonen inkubiert, die möglicherweise als physiologische Aktivatoren der Adenylatzyklase in Betracht kommen. In Abb. 4 werden die geprüften Substanzen dargestellt. In Anwesenheit von Glucagon (1×10^{-6}M), Oxytocin (1×10^{-6}M), Prostaglandin E_1 (2×10^{-5}M) oder Gammaaminobuttersäure (1×10^{-3}M) konnte keine Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität beobachtet werden.

Demgegenüber führte das ß-adrenerge DL-Isoproterenol (5×10^{-5}M), welches anstelle von Adrenalin eingesetzt wurde, sowie Lysin-Vasopressin (1×10^{-8}M) zu einer vermehrten Produktion von cAMP in der Zellmembran. Verglichen mit der Basalaktivität bewirkten, in Abhängigkeit von der Konzentration, Isoproterenol wie auch Vasopressin durchschnittlich eine zweifache Erhöhung der Adenylatzyklaseaktivität. Bei den zuletzt durchgeführten Versuchen, wohl durch Optimierung des Präparationsverfahrens der Zellmembran bedingt, wurden wiederholt Aktivierungen für Isoproterenol beziehungsweise Vasopressin um das etwa drei- beziehungsweise sechsfache erreicht.

Während die Antwort der Adenylatzyklase auf Fluorid und Choleratoxin (sowie auch auf Gpp(NH)p; s.u.) in Abhängigkeit von Membranpräparation und Lagerung relativ stabil war, wurde die cAMP-Produktion als Folge hormoneller Stimulation rasch zerstört. Tab. 1 b) weist auf den Verlust der hormonellen Ansprechbarkeit auf Isoproterenol nach verschiedenen Verfahren der Cochleaaufbereitung hin. Aber auch eine Lagerung des Innenohrs oder seiner aufbereiteten Fraktionen etwa über Nacht führte zum Abfall der Hormonantwort unter die Nachweisgrenze.

Abb. 4: Wirkung von Neurotransmittern und Hormonen auf die Innenohrmembran

Glucagon, GABA, PGE_1 sowie Oxytocin führten zu keinem Anstieg der Enzymaktivität gegenüber dem Basalwert. Dagegen wurde durch Isoproterenol und Vasopressin eine deutlich vermehrte cAMP-Bildung hervorgerufen.



Nur bei rascher Präparation des Innenohrs nahe $0^{o}C$ und sofortiger Testung gelang der Nachweis der Aktivierung durch Isoproterenol oder Vasopressin (Tab. 3).

Die für die halbmaximale Stimulation benötigte Konzentration betrug für Isoproterenol 1×10^{-6} und für Vasopressin 1×10^{-8}M (Abb. 5).

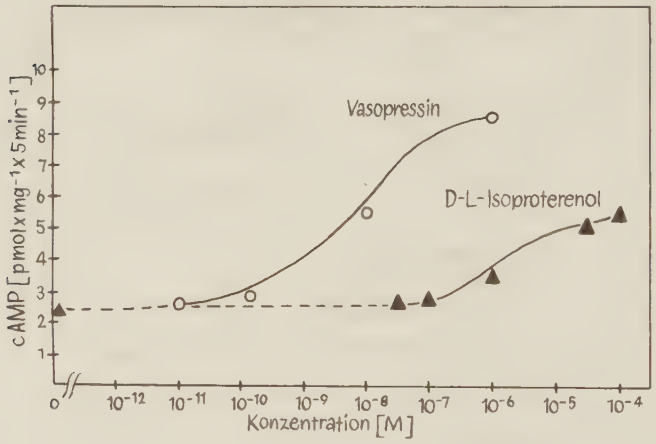
Tab. 3: Nachweis der Adenylatzyklaseaktivität durch Hormone in Abhängigkeit von verschiedenen Lagerungsbedingungen

Die Lagerung der Innenohrmembranen bei -80°C für 12 Stunden bis 4 Tage führt bei dem Versuch, sie durch Isoproterenol oder Vasopressin zu stimulieren zu keinem meßbaren Aktivitätsanstieg, bzw. keinem verläßlichem Ergebnis.
(+: deutlicher Anstieg der Enzymaktivität,
Ø: keine Enzymaktivität mehr.).

	Lagerungsbedingung		
Aktivator	- 80 °C, 4 Tage	- 80 °C, 12 h	Keine Lagerung
Gpp(NH)p ($1x10^{-5}$ mol) + Isoproterenol ($5x10^{-5}$ mol)	+	+	+
DL-Isoproterenol ($5x10^{-5}$ mol)	Ø	Ø	+
Vasopressin ($1x10^{-8}$ mol)	Ø	Ø/+	+

Abb. 5: Aktivierung der cochleären Adenylatzyklase durch D-L-Isoproterenol und Vasopressin:

Die Abbildung zeigt die im Text beschriebene Bildung von cAMP durch Isoproterenol und Vasopressin sowie die Abhängigkeit von der angegebenen Konzentration.

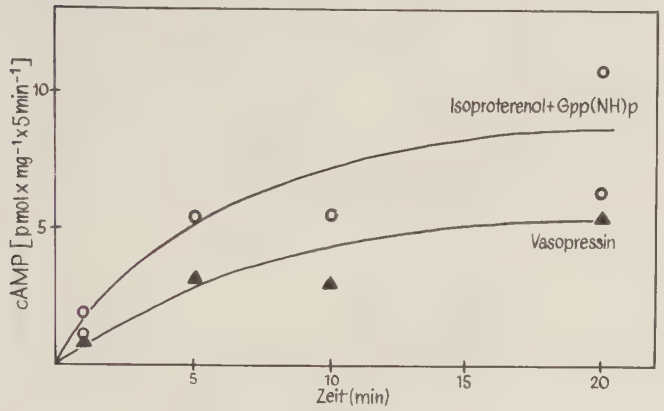


In Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation bei 37°C wurden die günstigsten Ergebnisse bei einer Inkubationszeit von zwanzig Minuten erreicht (Abb. 6).

In anderen Gewebssystemen wurde die interessante Beobachtung gemacht, daß Guanylnukleotide die hormonale Stimulation der Adenylatzyklase verstärken (35, 53). Ähnliche Ergebnisse konnten bei den Cochleapräparationen erzielt werden. Da das physiologische Guanylnukleotid GTP durch die Membran-GTPase sehr schnell metabolisiert wird, wurde stattdessen das nicht hydrolisierbare Analog Guanylylimidodiphosphat (Gpp(NH)p) verwendet, bei dem das terminale O durch eine NH-Gruppe ersetzt ist

Abb. 6: Bildung von cAMP durch Isoproterenol und Gpp(NH)p und Vasopressin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit:

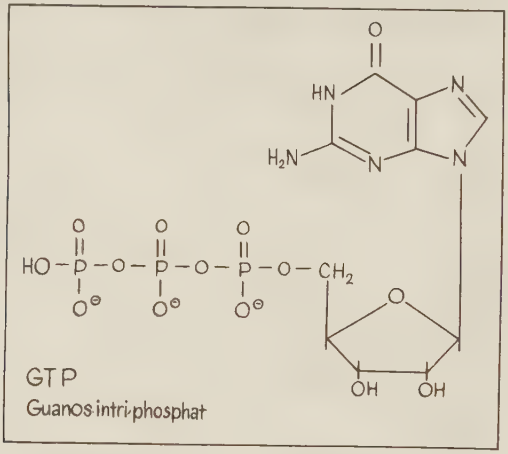
Die Schwankungen sind durch verschiedene Versuche bedingt. Die Proben wurden bei 37°C unterschiedlich lang inkubiert. Dabei wurden nach einer Inkubationszeit von 20 min. die besten Ergebnisse erzielt.

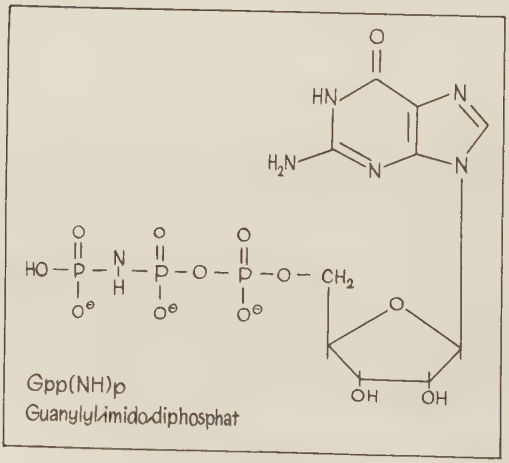


(Abb. 7). Kürzliche Studien haben nämlich gezeigt, daß Gpp(NH)p den stimulierenden Effekt von GTP im Adenylatzyklasesystem kopiert (35, 53). Dieses Analog erhöhte die Katecholaminaktivität in der Membranadenylatzyklase wirkungsvoller als GTP: In Anwesenheit von Isoproterenol und Gpp(NH)p wurde die Zyklaseaktivität im Durchschnitt auf das sechsfache gesteigert und zeigte insgesamt eine höhere Aktivität als durch Fluorid oder Vasopressin (Tab. 4, 5).

Abb. 7: Strukturformel von (a) Guanosintriphosphat (GTP) (8) und von (b) Guanylylimidodiphosphat (Gpp(NH)p)

Das terminale O des GTP ist durch NH ersetzt.





Tab. 4: Aktivierung der Cochlea-Adenylatzyklase durch Guanylnukleotide: Geringere Aktivierung durch das hydrolisierbare GTP .

Guanylnukleotid	cAMP (pmol x mg^{-1} x 5 min^{-1})
GTP (5×10^{-5} mol)	2, o
Gpp (NH) p (1×10^{-5} mol)	4, 7

Tab. 5: Aktivierung der Innenohradenylatzyklase durch Katecholamin und Guanylnukleotide:

Die Ergebnisse aus getrennten Versuchen von 18 verschiedenen Innenohrpräparationen zeigen, daß in Anwesenheit von Gpp(NH)p die Zyklaseaktivität durch Isoproterenol bis auf das sechsfache gesteigert wird .

Aktivator	cAMP (pmol x mg^{-1} x 5 min^{-1})
DL - Isoproterenol (5×10^{-5} mol)	o, 9 - 5, 3
Gpp (NH) p (1×10^{-5} mol)	2, o - 2o, 7
Isoproterenol + Gpp (NH) p	5, 3 - 33, o

5. DISKUSSION

Seit 1938 HALLPIKE und CAIRNS (15) entdeckten, daß der Endolymphhydrops Bestandteil der Ménièreschen Erkrankung ist, haben sich zahlreiche Forschergruppen mit der Morphologie und Physiologie der labyrinthären Flüssigkeitssysteme befaßt.

Man unterscheidet hierbei im wesentlichen zwei Räume, die nach ihrem Inhalt Endolymph- und Perilymphraum genannt werden (Abb. 1). Die Perilymphe befindet sich zwischen Knochen und Labyrinth und steht über den Aquaeductus cochleae mit dem Subarachnoidalraum in Verbindung. Sie ist natriumreich und kaliumarm. Die kaliumreiche Endolymphe füllt das häutige Labyrinth aus. Als Cortilymphe bezeichnet man eine mit der Perilymphe der Scala tympani in Verbindung stehende Flüssigkeit, die die Haarzellen umgibt. Ihre Elektrolytkonzentration soll der der Perilymphe entsprechen (5, 41).

Die Herkunft der Perilymphe ist bis heute - trotz einer erheblichen Anzahl von Ergebnissen - nicht eindeutig geklärt. Während einerseits ein Blutfiltrat postuliert wird, behaupten andere, die Perilymphe sei Liquor (48).

Die Endolymphproduktion findet nach Ansicht von KIMURA und SCHUKNECHT (20, 22) in der Stria vascularis sowie in den "dunklen Zellen" des vestibulären Labyrinths statt. Die Vermutung, daß es sich bei der Endolymphe überwiegend um ein Perilymphfiltrat handelt, wird durch Arbeiten von VOSTEEN sowie ORSULAKOWA erhärtet (34, 48).

Die Resorption dieser Flüssigkeit findet sehr wahrscheinlich im Saccus endolymphaticus statt. LUNDQUIST (28) beschreibt, daß insbesondere die hellen Zellen der Pars rugosa hierfür verantwortlich sein müssen.

Der Endolymphraum stellt ein geschlossenes System dar. Die Epithelzellen sind hier fest durch "Zonulae occludentes" verbunden (16, 17, 18). Der Perilymphraum hat als offenes System Zugang über den Aquaeductus cochleae zum Liquorraum und über Lymphspalten zur Mittelohrschleimhaut und den Perivascularspalten des Knochens (2, 3).

Die Aufrechterhaltung der normalen Flüssigkeitsverteilung zwischen beiden Räumen wird durch aktiven Ionentransport und passive Diffusion gewährleistet. Bei den aktiven Kräften handelt es sich um die elektropositive Kaliumpumpe und eine elektronegative Natrium-Kalium-Austauschpumpe (48).

Beide Pumpen sind sauerstoffabhängig mit der Folge, daß bei Anoxie die passive Diffusion überwiegt und zu einem Elektrolytausgleich zwischen Peri- und Endolymphe führt (10, 30). 1973 fand BOSHER (6), daß Ethacrynsäure die elektropositive Kaliumpumpe blockiert und somit den anoxischen Effekt verstärken kann.

Bei der elektronegativen Natrium-Kalium-Austauschpumpe wird eine entsprechende Wirkung durch Ouabain erreicht (25, 26).

Soweit Untersuchungen an humanen Felsenbeinen möglich waren, zeigten diese bei Ménière-Kranken einen Volumenzuwachs im Endolymphraum (27, 40). Diese auch als "progressiver Hydrops" bezeichnete Veränderung ist ebenfalls bei syphilitischer Labyrinthitis und dem sogenannten "delayed hydrops syndrom" anzutreffen (41).

Es stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um eine Überproduktion oder Minderresorption im Endolymphraum handelt (40).

SCHUKNECHT (39-42) fand bei der Untersuchung einiger Ohren chorioidplexusähnliche Strukturen in der Region des dilatierten Ductus reuniens. Möglicherweise führt ein stark sezernierendes Gewebe wie z. B. ein solcher Chorioidplexus zur Verstärkung der Endolymphproduktion (40). Die Atrophie der Stria vascularis, die im Rahmen histologischer Hydropsstudien beobachtet wurde, stellt die Theorie einer gesteigerten Produktion jedoch in Frage (23, 27).

Für eine Einschränkung der Resorptionsfähigkeit sprechen Versuche, bei denen durch Obliteration des Ductus endolymphaticus und Entfernen des Endolymphsacks bei Meerschweinchen ein Hydrops provoziert wurde. Dabei stellte man fest, daß die alleinige Zerstörung des Endolymphsacks nicht zu einer Volumenansammlung führt (23). Demgegenüber behauptet ZECHNER (51), daß bereits ein Hydrops entsteht, wenn die Endolymphe nicht mehr in die Pars rugosa des Endolymphsacks gelangt.

Trotzdem ist auch er der Ansicht, daß sowohl Ductus als auch Saccus endolymphaticus an der Resorption beteiligt sind. Anhand seiner pathohistologischen Hydropsstudien an menschlichen Felsenbeinen konnte er zeigen, daß die Bastsche Klappe Verziehungen und Zerdehnungen aufwies und der Ductus durch Detritus, bindegewebige oder knöcherne Verödung verlegt war. Die Pars rugosa als aktivster Teil des Saccus war durch Zottenatrophie, Zottenhyalinose, Epithelmeta- und Hyperplasie sowie allen Formen der Bindegewebshyperplasie - bei gleichzeitiger Minderdurchblutung auch Bindegewebshypoplasie - deutlich verändert (51).

Die erstmals von HALLPIKE und CAIRNS (15) erwähnte parisacculäre Fibrose scheint die Resorptionsfähigkeit auch zu beeinträchtigen (18). Als Folge des experimentell induzierten Hydrops sah KIMURA eine bevorzugt in der Cochleaspitze beginnende Degeneration der sensoneuralen Elemente (23). Entsprechende Beobachtungen beschrieben LINDSAY (27) und SCHUKNECHT (41) bei Patienten mit Morbus Ménière. SCHUKNECHT macht eine Anhäufung toxischer Nebenprodukte im Metabolismus dafür verantwortlich, die durch fehlende Endolymphsackfunktion nicht eliminiert werden können. Darüber hinaus stellte SCHUKNECHT bei einigen Patienten Distorsion und Kollaps des häutigen Labyrinths fest (41). Aus der resultierenden Zelldeformation erklären sich möglicherweise auch bleibende auditive und vestibuläre Schäden (41).

Nach TONNDORF (47) kann der Endolymphhydrops eine Dislokation der Basilarmembran einschließlich des Cortischen Organs bewirken; ein Ereignis, das zur Auskopplung von Haarzellen aus der Tectorialmembran

führt und Tinnitus, Recruitment und vielleicht sogar den teilweisen Verlust der Sprachverständlichkeit erklärt. Eine solche Veränderung konnte LINDSAY in drei Fällen erkennen (27). Es wird jedoch auch die Meinung, daß der Endolymphhydrops allein keinen Einfluß auf die sensoneuralen Strukturen ausübt (11), vertreten.

Diese Ansicht wird durch die Tatsache bestätigt, daß beim idiopathischen Hydrops keine Veränderungen an den nervalen Elementen auffindbar sind (27, 40).

Weitverbreitet ist die Auffassung, daß die Symptome beim Morbus Ménière durch eine Kalium-Intoxikation bedingt werden (11, 41). Die Sinneszellen des Labyrinths sind normalerweise von Perilymphe umgeben (39). Gelangt die kaliumreiche Endolymphe in den Perilymphraum, entstehen Schäden am Nervengewebe (43). Ursache hierfür scheinen eine Ruptur sowie Permeabilitätsstörungen des häutigen Labyrinths zu sein. Der Ruptur geht eine Erweiterung der endolymphatischen Räume voraus. Als erste Veränderungen sieht man Ausbuchtungen der Reißnerschen Membran (27, 40).

Bei Fortschreiten liegt die Membran der knöchernen Wandung an, dabei nimmt der Ductus cochlearis den gesamten Raum der Scala vestibuli ein (40).

Die Überdehnung kann Strukturveränderungen innerhalb der Membran bewirken, aus denen möglicherweise Permeabilitätsstörungen resultieren, zum anderen führt sie zur Ruptur (11, 12, 23, 27, 40). Bevorzugte Stellen, an denen das häutige Labyrinth einreißt, sind Helicotremanähe und Ampullenumgebung.

Die Endolymphe erreicht in den genannten Regionen die Sinneszellen. Sie führt in der Cochleaspitze zu Hörstörungen im niederfrequenten Bereich und erzeugt in der Ampulle Nystagmen (11). Beide Symptome sind für den Morbus Ménière typisch.

Erwähnenswert ist dabei, daß das klinische Bild dieser Erkrankung nicht streng einheitlich ist. Man unterscheidet neben der klassischen Form den

Morbus Ménière mit "drop attack", die mehr cochleäre und die mehr vestibuläre Form sowie das Lermoyez-Syndrom (11, 12). Daraus schließt DOHLMANN, daß das Bild der Ménièreschen Attacke abhängig ist vom Ort der Ruptur (11, 12).

Die von KIMURA und SCHUKNECHT (22) nachgewiesene ausgeprägte Heilungstendenz der Rupturen veranlaßt DOHLMANN zu der Vermutung, daß der Anfall dann abklingt, wenn durch eine solche Spontanheilung das häutige Labyrinth wieder geschlossen ist und das Kalium von der Perilymphe eliminiert wurde (11, 22, 23, 24).

JAHNKE (18) sieht den Anfallsmechanismus als Folge einer Zerstörung der Zellmembranfusionslinien innerhalb der Zonulae occludentes. Diese könnte durch endokrinen oder toxischen Einfluß entstehen (46). Die Aufgabe der Fusionslinien, eine Perilymph-Endolymphschranke aufrechtzuerhalten, kann nicht mehr erfüllt werden. Die Dauer des ausgelösten Anfalls ist hiernach von der Regeneration der Zellmembranfusionslinien abhängig und von der Beseitigung der Kaliumionen (18).

FELDMANN und BRUSILOW (13) provozierten durch Instillation von Choleratoxin in die Scala media einen Endolymphhydrops. In anderen Geweben, vornehmlich im Dünndarm, wirkt das Choleratoxin über das Enzym Adenylatzyklase. Dieses Enzym wurde von RALL und SUTHERLAND 1957 entdeckt, sowie seine Eigenschaft, die Synthese von cyclischem AMP und Pyrophosphat aus ATP zu katalysieren (44). Es scheint ausschließlich in der Zellmembran lokalisiert zu sein und war in nahezu allen bisher untersuchten Geweben nachzuweisen. Die Anwesenheit von Adenylatzyklase im Innenohr wurde von THALMANN und Mitarbeitern entdeckt (1).

Mittlerweile sind eine Reihe von Hormonen bekannt, die in anderen Geweben die Adenylatzyklase zur Bildung von zyklischem AMP stimulieren. Das cAMP spielt hierbei die Rolle des "second messenger", d.h., die spezifische Wirkung des jeweiligen Hormons wird nicht direkt sondern indirekt über die Bildung von zyklischem AMP erreicht. Der Mechanismus

folgt folgendem Schema: Das Hormon besetzt einen an der Membranaußenseite befindlichen Rezeptor, der für ihn spezifisch ist, d.h., jeder Rezeptor besteht aus einem Proteinmolekül, das eine spezifische Erkennungsseite für das entsprechende Hormon besitzt. Der Rezeptor erhält von dem Hormon ein Signal, welches über einen Transmitter (35, 53) auf das Erfolgsmolekül, die Adenylatzyklase, übertragen wird. Diese liegt dem Cytosol zugewandt an der Membraninnenseite. Auf diese Weise ist das Signal durch die Zellmembran in das Zellinnere transferiert worden.

Angeregt durch die geschilderten Ergebnisse von FELDMANN und BRUSILOW (13) sowie THALMANN (1) konnte bei eigenen Arbeiten festgestellt werden, daß Choleratoxin im Innenohr über die Adenylatzyklase wirkt. Als Testmaterial wurde ein wahrscheinlich stark heterogener Extrakt der Meerschweinchencochlea verwendet, der aus Membranen verschiedener Teile des Innenohrs sowie Blutgefäßwänden bestand. In anschließenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß von den bekannten physiologischen Aktivatoren der Adenylatzyklase Adrenalin und Vasopressin im Innenohr wirksam sind. Sie weisen auf eine hormonelle Kontrolle im Innenohr hin.

Adrenalin (bei den Versuchen wurde stattdessen Isoproterenol gebraucht) ist ein Hormon, das in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und im sympathischen Nervensystem gebildet wird. Es zählt aufgrund seiner chemischen Struktur zu den Katecholaminen. Diese Stoffklasse ist dafür bekannt, daß sie an Synapsentransmissionen beteiligt ist und Einfluß auf Membranpermeabilität und Transportphänomene hat (8). Im Meerschweincheninnenohr spielt Adrenalin über Aktivierung der Adenylatzyklase möglicherweise eine entsprechende Rolle.

Beim Vasopressin handelt es sich um ein Hormon des Hypophysenhinterlappens, das auch als Adiuretin bezeichnet wird. Es bewirkt zum einen Kontraktion der glatten Muskulatur der Blut- und Coronargefäße. Von größerer Bedeutung ist jedoch seine Eigenschaft, Wasser aus den distalen

Tubuli der Nierenkanälchen zurückzuresorbieren (8).

Aus einer Reihe von Arbeiten kann man entnehmen, daß eine deutliche Beziehung zwischen Niere und Cochlea einschließlich ihrer Antigenizität besteht (4, 37). Sie wurde auch in Studien über chronische Urämie und toxische Wirkung diverser Arzneistoffe gefunden (7, 32, 33). Diese auffällige Beziehung zwischen beiden Organen sowie die Tatsache, daß Vasopressin auch in der Niere über die Adenylatzyklase wirkt (19), läßt vermuten, daß dieses Hormon möglichen Einfluß auf den aktiven Wasser- und Ionentransport sowie auf Sekretionsmechanismen im Innenohr hat.

Der in dieser Arbeit geführte Nachweis der Aktivierung von cochleärer Adenylatzyklase durch Choleratoxin ergänzt die von FELDMANN und BRUSILOW (13) beschriebene Induktion eines Endolymphhydrops durch Choleratoxin beim Meerschweinchen. Eine enge Beziehung zwischen dem pathologisch-histologischen Substrat der Ménièreschen Krankheit und dem Enzym Adenylatzyklase konnte damit hergestellt werden. Zumindest im Tierexperiment kann durch Aktivierung eines via Endolymphe zugänglichen membranständigen Adenylatzyklasesystems ein Endolymphhydrops induziert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Beim M. Ménière handelt es sich um eine Erkrankung des Innenohrs, die anfallsweise mit Schwerhörigkeit, Ohrgeräuschen und Schwindel, häufig von Übelkeit und Erbrechen gefolgt, auftritt. Sein morphologisches Substrat ist ein Hydrops des Endolymphraumes, über dessen Genese sehr widersprüchliche Hypothesen aufgestellt wurden.

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Ménièreschen Erkrankung sind erschwert, weil ein geeignetes biochemisches Modell fehlt. Die vorliegende Arbeit knüpft an die kürzliche Beschreibung eines Labyrinthhydrops beim Meerschweinchen (13) durch intraendolymphatische Applikationen von Choleratoxin an. Es konnte gezeigt werden, daß in Analogie zu anderen Geweben Choleratoxin seine Wirkung im Innenohr durch Aktivierung des zellmembrangebundenen Enzyms Adenylatzyklase ausübt.

Da Choleratoxin lediglich eine experimentelle Hilfe bei der Aufklärung von Entstehungsmechanismen des Labyrinthhydrops darstellt, wurde in der Folge nach natürlichen Aktivatoren der Adenylatzyklase im Innenohr des Meerschweinchens gesucht. In Anwesenheit von Glukagon, Ocytocin, Prostaglandin oder Gammaaminobuttersäure konnte keine Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität beobachtet werden.

Demgegenüber führten das ß-adrenerge DL-Isoproterenol, welches anstelle von Adrenalin eingesetzt wurde, sowie Lysin-Vasopressin zu einer vermehrten Produktion von cAMP in der Zellmembran.

Darüber hinaus wurde die Hormonantwort auf Isoproterenol durch das GTP-Analog Guanylylimidodiphosphat moduliert.

Durch den in dieser Arbeit geführten Nachweis der Aktivierung von cochleärer

Adenylatzyklase durch Choleratoxin wurde die beschriebene Induktion eines Endolymphhydrops durch dieses Zellgift beim Meerschweinchen ergänzt. Eine enge Beziehung zwischen dem pathologisch-hystologischen Substrat der Ménièrschen Krankheit und dem Enzym Adenylatzyklase konnte damit hergestellt werden. Zumindest im Tierexperiment kann durch Aktivierung eines via Endolymphe zugänglichen membranständigen Adenylatzyklase-systems ein Endolymphhydrops induziert werden.

Herrn Professor Dr. W. KLEY danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Herr Professor Dr. K. FOET hat freundlicherweise das Korreferat übernommen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1)	AHLSTRÖM, M.S., I. THALMANN, R. THALMANN und I. ISE	Cyclic AMP and Adenylate Cyclase in the Inner Ear. Laryngoscope 85 (1975) 1241 - 1258.
2)	ARNOLD, W. und C. von ILBERG	Verbindungswege zwischen Liquor und Perilymphraum. Arch. Otorhinolaryngol. 198 (1971) 247 - 261.
3)	ARNOLD, W., R. RITTER, H.R. NITZE und W. WAGNER	Morphologische und kinetische Studien zum Lymphabfluß des Liquor cerebrospinalis. Arch. Otorhinolaryngol. 202 (1972) 389 - 394.
4)	ARNOLD, W., H. WEIDAUER und H.P. SEELIG	Experimenteller Beweis einer gemeinsamen Antigenizität zwischen Innenohr und Niere. Arch. Otorhinolaryngol. 212 (1976) 99 -117.
5)	BOENNINGHAUS, H.-G.	Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde. Springer, Berlin 1977.
6)	BOSHER, S.K., C.SMITH und R.L. WARREN	The Effects of Ethacrynic Acid upon the Cochlear Endolymph and Stria Vascularis. Acta Otolaryngol. 75 (1973) 184 - 191.
7)	BROWN, R.D. und A.M. FELDMANN	Pharmacology of Hearing and Ototoxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 18 (1978) 233 - 252.
8)	BUDDECKE, E.	Grundriß der Biochemie. De Gruyter, Berlin 1974.

9)	CHEVALIER, I. et al	A Time Course Study of Water Permeability and Morphological Alterations Induced by Mucosal Hyperosmolarity in Frog Urinary Bladder. Cell Tiss. Tes. 154 (1974) 345.
10)	DOHLMANN, G. und M. W. RADOMSKI	The Ion Selective Function of the Epithelium of the Membraneous Canal Walls. Acta Otolaryngol. 66 (1968) 409 - 416.
11)	DOHLMANN, G. F.	On the Mechanism of Ménière Attack. Arch. Otorhinolaryngol. 212 (1976) 301 - 307.
12)	DOHLMANN, G. F.	Mechanism of Ménière Attack. ORL 42 (1980) 10 - 19.
13)	FELDMANN, A. M. and S. W. BRUSILOW	Effects of Choleratoxin on Cochlear Endolymph Production: Model for Endolymphatic Hydrops. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 1761 - 1764.
14)	GILMANN, A. G.	A Protein Binding Assay for 3':5' - Cyclic Monophosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67 (1970) 305 - 312.
15)	HALLPIKE, C. S. und H. CAIRNS	Observations on the Pathology of Ménière's Syndrome. J. Laryngol. 53 (1938) 625.
16)	ILBERG, C. von	Elektronenmikroskopische Untersuchung über Diffusion und Resorption von Thoriumdioxid an der Meerschweinchenschnecke. Arch. Otorhinolaringol. 415 (1968) 426.
17)	ILBERG, C. von und K. H. VOSTEEN	Permeability of Inner Ear Membranes. Acta Otolaryngol. 67 (1969) 165 - 170.

18) JAHNKE, K. — Zur Pathogenese der akuten Symptome des Morbus Ménière. Laryngol. Rhinol. 56 (1977) 402- 406.

19) JARD, S., C. ROY, T. BARTH, R. RAJERISON und J. BOCKAERT — Antidiuretic-Sensitive Kidney Adenylate Cyclase. Adv. Cycl. Nucl. Res. 5 (1975) 31 - 54.

20) KIMURA, R.S. — Distribution, Structure and Function of Dark Cells in the Vestibular Labyrinth. Ann. Otol. 78 (1969) 542.

21) KIMURA, R.S. und H.F. SCHUKNECHT — The Ultrastructure of the Human Stria Vascularis (I). Acta Otolaryngol. 69 (1970) 415 - 427.

22) KIMURA, R.S. und H.F. SCHUKNECHT — Effect of Fistula on Endolymphatic Hydrops. Ann. Otol. 84 (1975) 271 - 286.

23) KIMURA, R. S. — Experimental Pathogenesis of Hydrops. Arch. Otorhinolaryngol. 212 (1976) 263 - 275.

24) KIMURA, R.S., H.F. SCHUKNECHT, C.Y. OTA und D.D. JONES — Experimental Study of Sacculotomy in Endolymphatic Hydrops. Arch. Otorhinolaryngol. 217 (1977) 123 - 137.

25) KUIPPERS, W. und S. BOUTING — The Cochlear Potentials: Pflügers Archiv 320 (1970) 348-372.

26) KUIPPERS, W. und S. BOUTING — Studies on (Na^+ - K^+)-Activated ATPase. Biochim. Biophys. Acta 173 (1969) 477.

27) LINDSAY, J.R. — Histopathology of Ménière's Disease as Observed by Light Microscopy. Otolaryngol. Clin. N. Amer. 1 (1968) 319 - 329.

28) LUNDQUIST, P.G. — Aspects on Endolymphatic Sac, Morphology and Function. Arch. Otorhinolaryngol. 212 (1976) 231 - 240.

29) MATSCHINSKY, F.M. und R. THALMANN — Energy Metabolism of Cochlear duct. In: Biochemical Mechanism in Hearing and Deafness (Papparella, M.M., Hrsg.). Thomas, Springfield 1970, S. 265-288.

30) MENDELSOHN, M. und T. KONISHI — The Effect of Local Anoxia on the Cations of the Endolymph. Ann. Otol. 78 (1969) 64 -75.

31) MÉNIÈRE, P. — Congestions cérébrales apoplectiformes. Académie de Médicine: Gaz. Med. Paris 16 (1861) 55 - 57 (vgl. auch Gaz. Med. Paris 16 (1861) 88-89; Gaz. Med. Paris 16 (1861) 597 - 601).

32) MERCK, W., G. HOPPE-SEYLER und I. CURTEN — Ultrastructual Changes of the Stria vascularis and the Spiral ligament in Chronic Uremic Rats. Arch. Otorhinolaryngol. 214 (1976) 63 - 70.

33) ODA, M., M.G. PRECIADO, C.A. QUICK und M.M. PAPARELLA — Labyrinthine Pathology of Chronic renal failure patients treated with hemodialysis and kidney transplantation. Laryngoscope 84 (1974) 1489 -1506.

34) ORSULAKOWA, A. — Experimentelle Untersuchungen über die passiven Austauschvorgänge zwischen Liquor cerebrospinalis, Blut und Innenohrflüssigkeiten. Diss. rer. nat., Düsseldorf 1975.

35) PFEUFFER, Th. — GTP-Binding Proteins in Membranes and the Control of Adenylate Cyclase Activity. J. Biol. Chem. 252 (1977) 7224 - 7234.

36)	POLITZER, A.	Geschichte der Ohrenheilkunde, Band II, Enke, Stuttgart 1913.
37)	QICK, C.A., A. FISH und C. BROWN	The Relationship between Cochlea and Kidney. Laryngoscope 73 (1973) 1469 - 1489.
38)	ROBISON, G.A., R.W.BUTCHER und E.W. SUTHERLAND	The Catecholamines. In: Cyclic AMP. Academic Press, N.Y.1971 S. 145 - 231.
39)	SCHUKNECHT, H.F. und A. EL SEIFI	Experimental Observations on the Fluid Physiology of the Inner Ear. Ann.Otol.72 (1963) 687 - 712.
40)	SCHUKNECHT, H.F.	Pathology of Ménière's Disease. Otolaryngol. Clin. N.Amer.1 (1968) 331 -337.
41)	SCHUKNECHT, H.F.	Pathophysiology of Endolymphatic Hydrops. Arch. Otolaryngol. 212 (1976) 253 - 263.
42)	SCHUKNECHT, H.F.	Zur Pathophysiologie des M. Ménière. Extracta Otolaryngol. 3 (1980) 12.
43)	SILVERSTEIN, H. und H.F. SCHUKNECHT	Biochemical Studies of Inner Ear Fluids in Man. Arch. Otolaryngol. 84 (1966) 395 - 402.
44)	SUTHERLAND, E.W.	Nobelpreisvortrag. Angew. Chem. 84 (1972) 1117.
45)	TASAKI, I. und C. FERNANDEZ	Modification of Cochlear Microphonics and Action Potentials by KCl solution and by directs currents. J.Neurophysiol. 15 (1952) 497.

46)	TICE, L.W., S.H. WOLLMANN und R.C. CARTER	Changes in Tight Junctions of Thyroid Epithelium With Changes in Thyroid Activity. J. Cell. Biol. 66 (1975) 657.
47)	TONNDORF, J.	Endolymphatic Hydrops: Mechanical Causes of Hearing Loss. Arch. Otorhinolaryngol. 212 (1976) 293 - 299.
48)	VOSTEEN, K.-H.	Die Produktion von Endo- und Perilymphe und die Durchlässigkeit der Innenohrmembranen. Arch. Otorhinolaryngol. 212 (1976) 219 - 229.
49)	WATANABE, J.	Ménière's Disease with Special Emphasis on Epidemiology, Diagnosis and Prognosis. ORL 42 (1980) 20 - 45.
50)	WULLSTEIN, H.L. und S. RAUCH	Endolymph und Perilymph in Ménière's disease. Arch. Otorhinolaryngol. 73 (1961) 262 - 267.
51)	ZECHNER, G.	Pathohistologie des Ductus und Saccus endolymphaticus beim Innenohrhydrops. Arch. Otorhinolaryngol. 212 (1976) 277 - 286.
52)	CASSEL, D. und Th. PFEUFFER	Mechanism of Choleratoxin action. Proc. Natl. Acad. Sci. 75 (1978) 2669 - 2673.
53)	RODBELL, M.	The Role of Hormone Receptors and GTP-Regulatory Proteins in Membrane Transduction. Nature 284 (1980) 17 - 21.

8. LEBENSLAUF

Am 27. August 1950 wurde ich in Göttingen als Tochter des Arztes Dr. med. Horst Klehn und dessen Ehefrau Ilse, geb. Grimme, geboren.

Aufgewachsen bin ich in Wolfenbüttel, wo ich von 1957 bis 1969 die Schule besuchte und 1969 das Abitur ablegte.

Eine zweijährige Ausbildung als Apothekerpraktikantin schloß ich mit dem Pharmazeutischen Vorexamen im Juli 1971 in Braunschweig ab. Bis 1973 war ich als Apothekerassistentin in Apotheken in Salzgitter und Wolfenbüttel tätig.

Ab 1973 studierte ich an der Universität Würzburg Medizin. Hier bestand ich 1975 die Ärztliche Vorprüfung, 1976 den Ersten Teil, 1978 den Zweiten Teil und 1979 den letzten Teil der Ärztlichen Prüfung. Anschließend erhielt ich die Approbation als Ärztin.

Gegenwärtig bin ich als Ärztin beim Institut Würzburg des Blutspendedienstes des Bayerischen Roten Kreuzes tätig.

Birgit Zimmer

Druckerei A. Staudenraus Würzburg